

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 6 月 20 日 (20.06.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/48135 A1

(51) 国際特許分類: C07D 313/00, 493/04,
A61K 31/365, A61P 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/10927

(22) 国際出願日: 2001 年 12 月 13 日 (13.12.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2000-379995
2000 年 12 月 14 日 (14.12.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目
5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土屋政幸
(TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]. 大友俊彦 (OHTOMO,

Toshihiko) [JP/JP]. 小野浩一郎 (ONO, Koichiro) [JP/JP].
松本雅彦 (MATSUMOTO, Masahiko) [JP/JP]. 伊藤達
也 (ITO, Tatsuya) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市
駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒
100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手
町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ,
TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: TAK1 INHIBITORS

(54) 発明の名称: TAK1阻害剤

(57) Abstract: TAK1 inhibitors or TAK1 activation inhibitors containing as the active ingredient zearalenones having hydroxyl groups at both of the 8- and 9-positions; a method of inhibiting TAK1 or a method of inhibiting the activation of TAK1 by using as the active ingredient zearalenones having hydroxyl groups at both of the 8- and 9-positions; utilization of zearalenones having hydroxyl groups at both of the 8- and 9-positions for producing TAK1 inhibitors or TAK1 activation inhibitors; and kits for inhibiting TAK1 or kits for inhibiting the activation of TAK1 containing zearalenones having hydroxyl groups at both of the 8- and 9-position and a manual.

(57) 要約:

8 位及び 9 位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類を有効成分とする、
TAK 1 阻害剤または TAK 1 活性化阻害剤、8 位及び 9 位のいずれにも水酸基
を有するゼアラレノン類を有効成分として使用する TAK 1 を阻害する方法また
は TAK 1 活性化を阻害する方法、TAK 1 阻害剤または TAK 1 活性化阻害剤
を製造するための 8 位及び 9 位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類の使
用、8 位及び 9 位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類および使用説明書
を含む TAK 1 を阻害するためのキットまたは TAK 1 の活性化を阻害するた
めのキット。

WO 02/48135 A1



添付公開書類：
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

TAK1 阻害剤

技術分野

- 5 本発明は、特定のゼアラレノン類を有効成分とする TAK1 阻害剤、特定のゼアラレノン類を有効成分とする TAK1 活性化阻害剤、特定のゼアラレノン類を有効成分として使用する TAK1 を阻害する方法、特定のゼアラレノン類を有効成分として使用する TAK1 活性化を阻害する方法、TAK1 阻害剤を製造するための特定のゼアラレノン類の使用、TAK1 活性化阻害剤を製造するための特定のゼアラレノン類の使用、特定のゼアラレノン類および使用説明書を含む TAK1 を阻害するためのキット、並びに特定のゼアラレノン類および使用説明書を含む TAK1 の活性化を阻害するためのキットに関する。

背景技術

- 15 細胞内のシグナル伝達に関与する一連の系として、マイトジェン-活性化プロテインキナーゼ (Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK) 系が知られている。MAPK 系は受容体のシグナルを種々の作用に転換する保存された真核細胞性シグナル伝達系である。MAPK 系は 3 種類のプロテインキナーゼ、すなわち MAPKKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase)、MAPKK (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase)、MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) を含む。MAPK は MAPKK によるリン酸化で活性化される。MAPKK は MAPKKK によるリン酸化で活性化される (Trends Biochem. Sci. (1993) 18, 128 ; Trends Biochem. Sci. (1993) 19, 236 ; Trends Biochem. Sci. (1993) 19, 470 ; Cell (1995) 80, 179) 。
- 20
- 25 細胞内のシグナル伝達系において機能する MAPKKK ファミリーの一つである TAK1 (TGF- β -Activated Kinase 1) は Yamaguchi, K.らにより同定された蛋白質であり (Science (1995)270, 2008)、TGF- β のシグナル伝達に関与し TGF- β により活性化されることが明らかになっている。また、TAK1 に結合し、TAK1 を活性化する TGF- β のシグナル伝達系に関与する蛋白質である TAB1

(TAK1 Binding Protein 1) が Shibuya, H.らにより同定された (Science (1996) 272, 1179-1182)。TAB1 は TAK1 に結合して TAK1 のキナーゼ活性を活性化し、MAPKK である MKK4 や MKK3/6 の活性化を通じ、c-Jun N-terminal kinase (JNK) や p38 MAPK の活性化を誘導し、TGF- β 等のシグナルを伝達する (J. Biol. Chem., (1996) 271, 13675-13679 ; J. Biol. Chem., (1997) 272, 8141-8144)。さらに、活性化 TAK1 の発現により心肥大、さらには心不全を誘導することが明らかとなった (Nature Med., (2000) 6, 556-563)。

また最近になり、TAK1 がインターロイキン-1 (IL-1) と腫瘍壊死因子 (TNF) の刺激等の各種ストレスによっても活性化されることが明らかになり (J. Biol. Chem. (1997) 272, 8141-8144 ; J. Biol. Chem., (1999) 274, 10641-10648)、TAK1 は IL-1 のシグナル伝達系において MAPK カスケードを介した JNK の活性化、ならびに nuclear factor- κ B (NF- κ B)-inducing kinase (NIK)、I κ B kinases (IKK)の活性化を通じたNF- κ Bの活性化に関与することが明らかになった (Nature (1999) 398, 252-256 ; Mol. Cell, (2000) 5, 649-658)。さらに、LPS 刺激により TAK1 が活性化され、NF- κ Bの活性化を誘導し、LPS のシグナル伝達への関与が明らかになった (FEBS Lett., (2000) 467, 160-164)。

TGF- β は多くの細胞機能を制御する多機能因子であり、その一つとして TGF- β は様々な傷害に伴う組織の修復および再生を司る (New Engl. J. Med., (1994) 331, 1286-1292)。しかしながら、慢性化した傷害においては TGF- β の異常産生により、組織の修復、再生のバランスが崩れ病的な線維化を生ずることがある。TGF- β は細胞外マトリックス蛋白質の産生を亢進させ、細胞外マトリックス分解酵素の合成の阻害、ならびに細胞外マトリックス分解酵素の阻害因子を誘導する事により、種々の臓器、例えば肝臓、腎臓等の線維症の主要な原因因子として作用することが明らかになっている (New Engl. J. Med., (1994) 331, 1286-1292)。また、その他の作用としては、細胞増殖阻害活性 (Cell (1990) 63, 245-247)、単球遊走活性 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1987) 84, 5788-5792)、生理活性物質誘導活性 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1987) 84, 5788-5792)、 β アミロイド蛋白質沈着作用 (Nature, (1997) 389, 603-606) が知ら

れている。肝線維症、肺線維症、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、腎硬化症、血管再狭窄、ケロイド症、強皮症、眼科手術後の瘢痕化、増殖性網膜症、自己免疫疾患およびアルツハイマー症などの疾病と TGF- β の異常産生の関連が報告されている。

- 5 IL-1 や TNF 等の炎症性サイトカインは、異物の侵入による炎症などの生体防御因子として重要な役割を果たしているが、この反応が過剰に発現すると、逆に様々な病態を引き起こす事が知られている。IL-1 は免疫及び炎症反応において重要なメディエーターであると考えられ、様々な細胞に働いて、それぞれの細胞機能を亢進する。その結果、T、B リンパ球の分化及び増殖、IL-2 やコロニー
- 10 刺激因子、IL-6、IL-8、TNF 等の炎症性サイトカインの産生、発熱・睡眠・食欲低下・低血圧の誘導、脳下垂体からのホルモン分泌亢進、コラゲナーゼの産生亢進による関節軟骨の破壊、プロスタグランジン産生亢進による痛覚閾値の低下をそれぞれ誘導し、さらにランゲルハンス島の β 細胞の破壊、骨髄性白血病細胞の増殖、関節炎、腸炎等の炎症への関与、動脈硬化プラークの形成など多彩な生理反応への関与が明らかになっている。また、IL-1 の過剰産生が原因と考えられている疾病として慢性関節リウマチ、骨粗鬆症、敗血症、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、動脈硬化症、乾癬、喘息、アルコール性肝炎等が知られている (TIPS,
- 15 (1988) 9, 171-177 ; New Engl. J. Med., (1993) 328, 106-113 ; Blood, (1996) 87, 2095-2147) 。
- 20

- また、TNF α は生体内に侵入した異物抗原との接触により活性化されたマクロファージ等の細胞より放出され、マクロファージの走化性、貪食能を亢進させるばかりでなく、T リンパ球の HLA 抗原の発現を増強し、また IL-2 受容体の発現の増加を通じて T 細胞の機能を賦活化、さらに好中球の走化性の亢進、活性化を誘導し、異物の除去に働く。また、炎症局所の線維芽細胞に対しては増殖促進に働き、その組織修復を行っている。さらに、TNF α はこれらの細胞より
- 25 種々のサイトカインの発現を亢進させ、IL-1 と同様にサイトカインネットワークの形成に関与している。しかし、これらの反応が過剰に発現すると増悪因子として働くことがあり、TNF α の過剰産生が知られている疾患として、敗血症、

慢性関節性リウマチ、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、SLE、川崎病等が報告されている（日本臨床、(1999) 57、Suppl:794-797）。

従って、TAK1 キナーゼ活性もしくは TAK1 の活性化を抑制する物質が見出されれば、TAK1 がシグナル伝達に関与する事が知られている TGF- β 、IL-1、
5 LPS、TNF 等が原因因子として知られている各種疾病、並びに心肥大、心不全の治療および予防薬の開発につながると考えられる。しかしながら、現在までに TAK1 キナーゼ阻害剤、もしくは TAK1 活性化阻害剤は知られていない。

ところで、ゼアラレノン類は、これまでに種々の化合物が報告されており、また、種々の作用、例えば、サイトカイン、特に IL-1 の産生抑制（特開平 8-
10 40893 号公報、欧州第 606044 A 号公報など）、チロシンキナーゼ阻害（WO 96/13259 号公報）、MEK1 キナーゼ阻害に基づく T 細胞の活性化及び活性化に伴う増殖阻害（Biochemistry, 37; 9579-9585, 1998）、JNK/
p38 活性化の阻害（Biochem. Biophys. Res. Commun., 257;19-23, 1999）、MEK 阻害（J. Antibiotics, 52;1086-1094, 1999）、LPS 刺激後のサイトカイン（IL-1、IL-6、TNF- α ）産生阻害（Int. J. Immunopharmacol.,
15 21;799-814, 1999）、LPS、IFN- γ 刺激後のサイトカイン（IL-1 β 、TNF- α ）産生抑制（Cytokine, 8;751-761, 1996）など、についても報告されている。

しかし、これまで、ゼアラレノン類が TAK1 あるいは TAK1 活性化を阻害する作用を有することは知られていない。また、8 位および 9 位のいずれにも水酸
20 基を有するゼアラレノン類が特に優れた該作用を有することも全く知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、TAK1 阻害剤、あるいは、TAK1 活性化阻害剤を提供することである。本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、
25 ある種のゼアラレノン類が優れた TAK1 キナーゼ阻害活性を持ち、また、TAK1 の活性化を介した TGF- β や IL-1 等のシグナル伝達を阻害することを見出し、この知見に基づき本発明を完成した。

すなわち、本発明は、8 位および 9 位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノ

ン類を有効成分とする、TAK1阻害剤またはTAK1活性化阻害剤を提供する。

また、本発明は、8位及び9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類を有効量用いる、TAK1を阻害する方法またはTAK1の活性化を阻害する方法を提供する。

- 5 さらに、本発明は、TAK1阻害剤またはTAK1活性化阻害剤を製造するための8位及び9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類の使用を提供する。

加えて、本発明は、8位及び9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類および使用説明書を含むTAK1を阻害するためのキットまたはTAK1の活性化を阻害するためのキットを提供する。

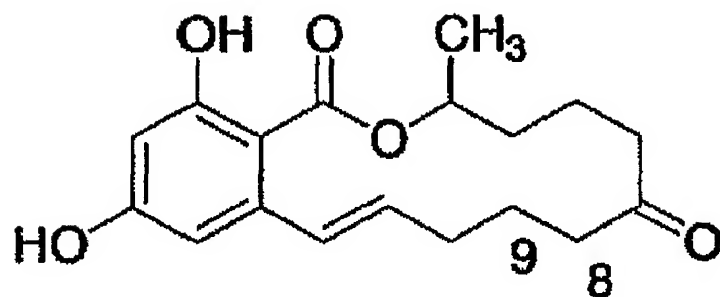
10

図面の簡単な説明

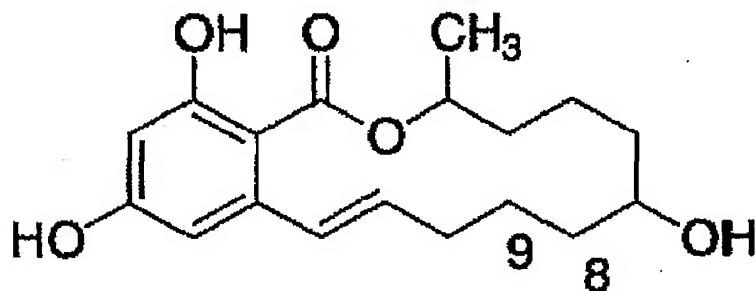
図1は、化合物(1)のTAK1を介したシグナル伝達阻害作用を示すグラフである。

15 発明を実施するための最良の形態

本発明において、8位および9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類には、ゼアラレノン(Zearalenone:下記式(A))またはゼアラレノール(Zearalenol:下記式(B))



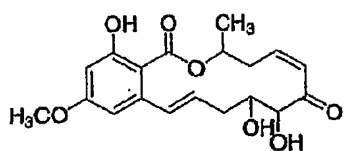
(A)



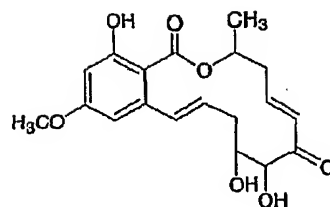
(B)

から誘導される化合物であって、その8位および9位のいずれにも水酸基（-OH）を有する化合物が含まれる。これら化合物には、光学異性体、幾何異性体が存在し得るがそれらのいずれも、およびそれら任意の割合の混合物も本発明に含まれる。

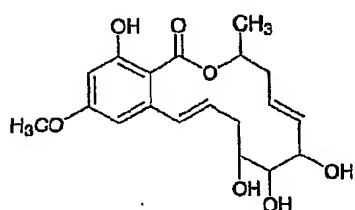
8位および9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類としては、具体的には、例えば、以下に示されるような化合物が含まれる：



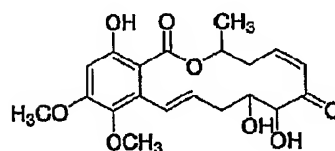
(1)



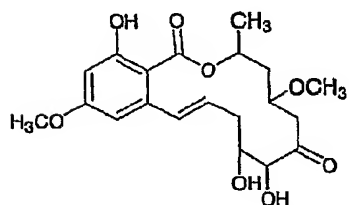
(2)



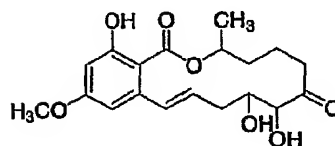
(3)



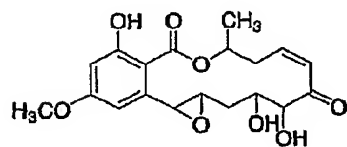
(4)



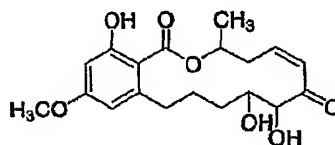
(5)



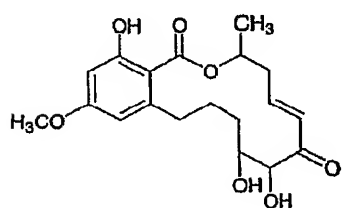
(6)



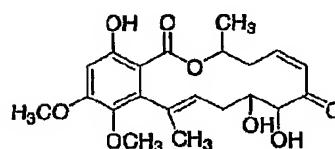
(7)



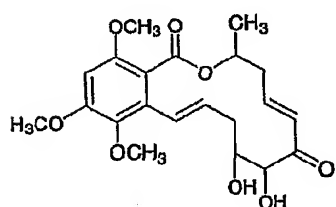
(8)



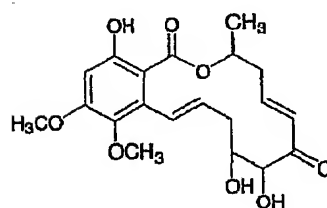
(9)



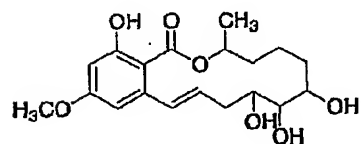
(10)



(11)



(12)



(13)

これら化合物（１）～（１３）は、各々それ自体公知の化合物であり、文献（例えば、Int. J. Immunopharmacol., 21:799-814, 1999 ; J. Org. Chem., 43: 2339-2343, 1978 ; Chem. Pharm. Bull. 41:373-375, 1993 ; J. Antibiotics, 52:1077-1085, 1999 ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 257:19-23, 1999 ;
5 Cytokine, 8:751-761, 1996 ; Pharmacol. Commun., 7:301-308, 1996 ; 日本特許公開平 ８－４０８９３号公報 ; 欧州特許公開第 ６０６０４４Ａ号公報 ; Biochemistry, 37: 9579-9585, 1998 など）に記載の方法により調製することができる。

8 位および 9 位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類としては、化合物
10 （１）～（１３）が好ましく、化合物（１）～（３）がさらに好ましく、化合物（１）が特に好ましい。

本発明において、TAK 1 阻害とは、TAK 1 のキナーゼ活性を阻害することを意味する。TAK 1 の阻害活性は、例えば、後述の実施例 1 に記載された方法により測定することができる。

15 TAK 1 活性化阻害とは、TAK 1 を介した細胞内シグナル伝達を阻害することを意味する。TAK 1 阻害活性化阻害作用は、例えば、後述の実施例 2 に記載された方法により測定することができる。

疾病の原因として TAK 1 の活性化が関与する疾病には、TAK 1 の活性化を介した細胞内のシグナル伝達系に関与する TGF- β 、IL-1、LPS、TN
20 F 等を原因因子とする各種疾病、並びに、心肥大、心不全などが含まれる。

本発明の TAK 1 キナーゼ阻害剤または TAK 1 活性化阻害剤の投与経路、投与量は、患者の体型、年齢、体調、疾患の種類や度合い、発症後の経過時間等により、適宜選択することができるが、非経口投与の場合には、一般に 0.02 μ g ~ 2mg / 体重 kg / 日の用量で、経口投与の場合には、一般に 5 μ g ~ 500mg /
25 体重 kg / 日の用量で効果が期待できる。

本発明において 8 位および 9 位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類は 1 種用いてもよいし、あるいは 2 種以上を組み合わせ用いてもよい。

本発明の TAK 1 阻害剤または TAK 1 活性化阻害剤は、1 種もしくはそれ以上の薬学的に許容し得る希釈剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、補助剤、防腐剤、緩

衝剤、結合剤、安定剤などを適宜含む薬学的組成物として、目的とする投与経路に応じ、適当な任意の形態にして投与することができる。

また、本発明のキットは、前記の 8 位及び 9 位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類、希釈剤および上で例示した種々の担体を含む任意の 1 種以上の担体を含む薬学的組成物、並びに使用説明書等を含む。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

10

TAK1 キナーゼ阻害活性の評価

(実施例 1) 化合物 (1) ~ (3) の TAK1 キナーゼ阻害活性の検討

TAK1 キナーゼ活性は TAK1 の自己リン酸化、ならびに TAB1 のリン酸化を測定することで評価した。すなわち、TAK1 及び TAB1 遺伝子を含有した組み換えバキュロウイルスベクター (WO 99/21010 号公報) をそれぞれ昆虫細胞 Sf-9 に共感染させ、3 日間培養した。培養後、細胞を PBS で洗浄し、 3.0×10^7 細胞/mL となるように抽出液 (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 12.5 mM β -glycerophosphate, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 10 mM NaF, 2 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 20 μ M Aprotinin, 0.5% Triton X-100) に懸濁し細胞抽出液を調製した。細胞抽出液 10 μ L に抗 TAK1 抗体 M-17 (SantaCruz 社製) 100 ng、及び ProteinG-Sepharose (Amersham Pharmacia 社製) 1 μ L を加え、4°C でインキュベートした後、免疫沈降物を洗浄液 (20 mM HEPES, pH 7.4, 500 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$) で 3 回洗浄、続いてキナーゼ溶液 (10 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$) で 2 回洗浄し、TAK1/TAB1 精製物を調製した。TAK1/TAB1 精製物をキナーゼ溶液に再懸濁し、Multiscreen プレート (Millipore 社製) の各穴に 25 μ L ずつ加えた後、DMSO に溶解した試験化合物を 1 μ L ずつ加え、室温にて 30 分間インキュベートした。続いて、1 ウエル当たり 0.1 μ Ci となるように [γ - ^{32}P] - ATP (Amersham Pharmacia 社製) を加えた溶液 (100 mM MOPS, pH 7.2,

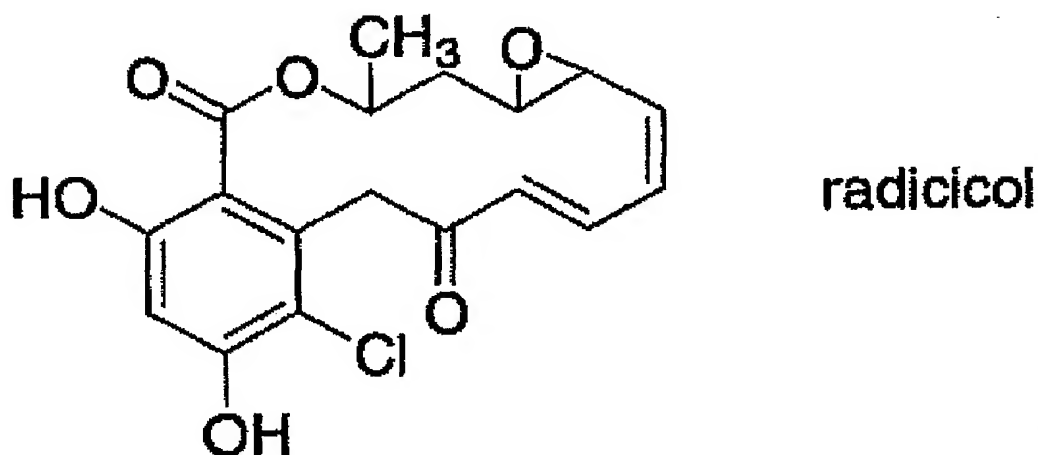
10 mM MgCl_2 、2 μM ATP) を 25 μL ずつ加え、37℃にて 30 分間インキュベートしキナーゼ反応を行った。反応停止液 (50% TCA 含有 PBS) を 50 μL ずつ加え、さらに 4℃にて 10 分間インキュベートし、キナーゼ反応を停止した。

フリーの ^{32}P -ATP を除去するために、0.05% Tween-20 を含有する PBS で 5 回

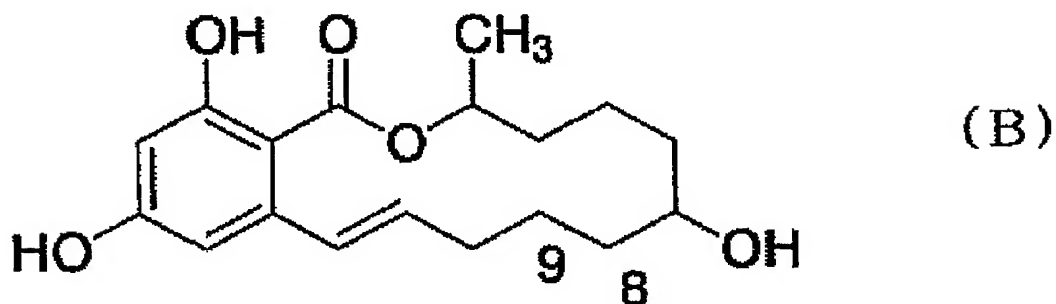
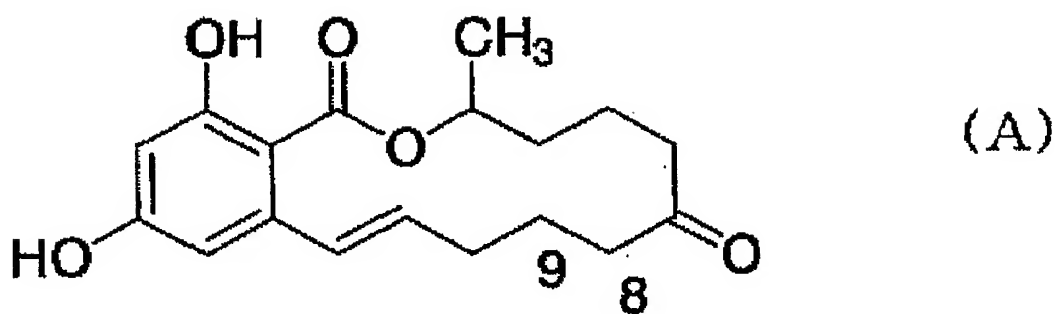
5 洗浄し、50 μL ずつの Supermix (Wallac 社製) を加え、さらに室温にて 30 分間清置した後 TAK1 及び TAB1 に取り込まれた ^{32}P -ATP 量を micro-beta により測定することで TAK1 キナーゼ活性を測定した。その結果、化合物 (1) ~

(3) は表 1 に示すように TAK1 キナーゼ活性を抑制し、特に化合物 (1) は IC_{50} 値として 8.1 nM の TAK1 キナーゼ阻害活性を示した。しかしながら、化合物

10 物 (1) ~ (3) の 8 位および 9 位に対応する位置に水酸基を有しない化合物である下記の Radicicol



15 、ゼアラレノン (式 (A))、ゼアラレノール (式 (B))



は TAK1 キナーゼ阻害活性はほぼ認められなかった。

5 表1

	I C ₅₀ (M)
化合物 (1)	8. 1 × 10 ⁻⁹
化合物 (2)	1. 2 × 10 ⁻⁷
化合物 (3)	6. 9 × 10 ⁻⁶
Radicicol	> 1 × 10 ⁻⁵
ゼアラレノン	> 1 × 10 ⁻⁴
ゼアラレノール	> 1 × 10 ⁻⁴

(実施例 2) TAK1 を介したシグナル伝達阻害作用の検討

TAK1 の活性化により MAPK カスケードならびに NF- κ B の活性化が誘導されることが知られている。そこで、TAK1 キナーゼ活性の阻害により TAK1 を介したシグナル伝達への影響をレポーターアッセイを用い検討した。

- 5 初めに、TGF- β 応答性エレメントの下流にルシフェラーゼの遺伝子を組み込んだ p3TP-Lux (Cell, 71, 1003-1014, 1992) を用い、化合物 (1) の影響を検討した。ヒト fibrosarcoma 細胞株 HT-1080 細胞 1×10^6 個を播種し終夜培養した後、 $2 \mu\text{g}$ の p3TP-Lux と $10 \mu\text{L}$ の FuGENE 遺伝子導入試薬 (Roche 社製) の混合物を細胞に添加し、さらに 8 時間培養し遺伝子を導入した。遺伝子を導
- 10 入した細胞をトリプシンにより剥がした後、1 ウエル当たり 1×10^4 個となるように 96 穴マイクロプレート (Falcon 社製) に播種し、さらに終夜培養した。DMEM 培地で 1 回洗浄した後、0.2% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で希釈した化合物 (1) を $50 \mu\text{L}$ ずつ添加した。37°C で 1 時間インキュベートした後、終濃度で 10 ng/mL となるように TGF- β (Promega 社製) を $50 \mu\text{L}$ ずつ加え、
- 15 さらに 24 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は Steady Glo Luciferase Assay Kit (Promega 社製) を用いて測定した。

- また、NF- κ B の活性化の測定には応答性エレメントの下流にルシフェラーゼの遺伝子を組み込んだ NF κ B-Luc (Genes Dev., 7, 1354-1363, 1993) を用い、IL-1 刺激、又は TAK1/TAB1 強制発現により TAK1 の活性化を誘導を行った。
- 20 すなわち、ヒト胎児腎細胞株 293 細胞に IL-1 受容体を強制発現させた 293-IL1R 細胞 (Mol. Cell, 5, 649-658, 2000) を 1×10^6 個を播種し終夜培養した後、 $2 \mu\text{g}$ の NF κ B-Luc と $10 \mu\text{L}$ の FuGENE 遺伝子導入試薬 (Roche 社製) の混合物を細胞に添加し、さらに 8 時間培養し遺伝子を導入した。遺伝子を導入した細胞をトリプシンにより剥がした後、1 ウエル当たり 1×10^4 個となるように
- 25 96 穴マイクロプレート (Coating Coaster 社製) に播種し、さらに終夜培養した。DMEM 培地で 1 回洗浄した後、0.2% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で希釈した化合物 (1) を $50 \mu\text{L}$ ずつ添加した。37°C で 1 時間インキュベートした後、終濃度で 10 ng/mL となるように IL-1 α (PEPRO TECH 社製) を $50 \mu\text{L}$ ずつ加え、さらに 24 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は Steady Glo

Luciferase Assay Kit (Promega 社製) を用いて測定した。TAK1/TAB1 強制発現による NFkB の活性化に関しては、NFkB-Luc の遺伝子導入と共に、TAK1、TAB1 発現ベクター pTAK1-HA ならびに pCOS-FTAB1 をそれぞれ 250 ng ずつを同時に加え、上記と同様に遺伝子を導入した。遺伝子を導入した細胞は上記と同様に 96 穴マイクロプレート (Coating Coaster 社製) に播種し、終夜培養した後、DMEM 培地で 1 回洗浄し、0.2% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で希釈した化合物 (1) を 50 μ L ずつ添加した。37°C で 24 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

結果を図 1 に示す。図 1 において、縦軸は、阻害活性 (%) を示す。横軸は、化合物 (1) 濃度 (M) を示す。黒塗り四角は、p3TP-Lux アッセイにおける TGF- β シグナル伝達経の阻害活性を示す。黒塗り三角は NFkB-Luc アッセイにおける IL-1 シグナル伝達系の阻害活性を示す。白抜き三角は NFkB-Luc アッセイにおける TAK1/TAB1 強制発現によるシグナル伝達系の阻害活性を示す。

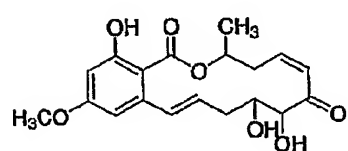
図 1 に示すように、化合物 (1) は容量依存的に TGF- β 、IL-1 α 、ならびに TAK1/TAB1 強制発現によるルシフェラーゼの発現を抑制した。この結果は TAK1 キナーゼ活性の阻害により下流へのシグナル伝達を阻害できることを示唆する。

産業上の利用の可能性

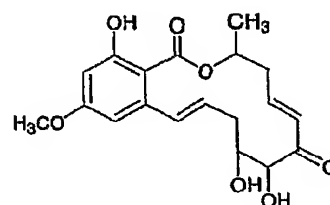
本発明の化合物は、は TAK1 阻害作用を有するので、TAK1 の活性化を介した各種シグナル伝達系を阻害し、疾病の原因として TAK1 の活性化が関与する各種疾病、例えば、TGF- β 、IL-1、LPS、TNF- α 等が原因因子として知られる各種疾病の治療および予防する薬剤として有用であることが期待される。

請 求 の 範 囲

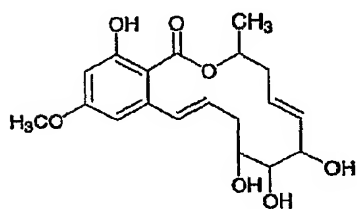
1. 8位及び9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類を有効成分とする、TAK1阻害剤またはTAK1活性化阻害剤。
- 5 2. 8位および9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類が、下記の化合物(1)～(13)



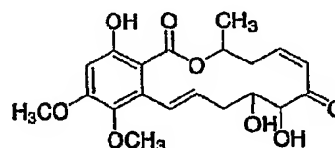
(1)



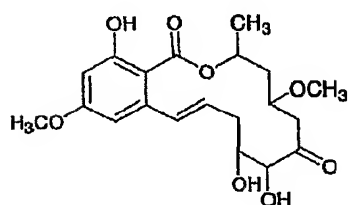
(2)



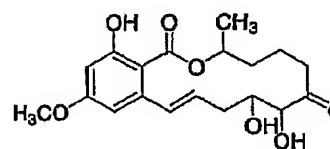
(3)



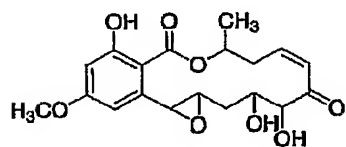
(4)



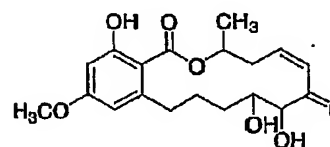
(5)



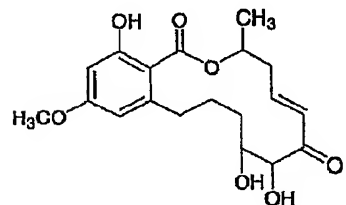
(6)



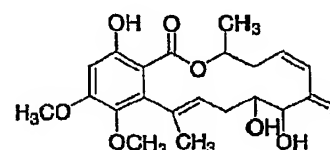
(7)



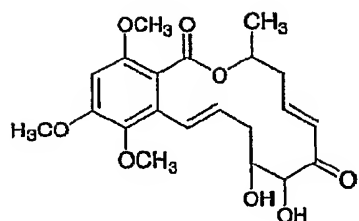
(8)



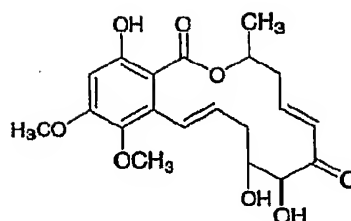
(9)



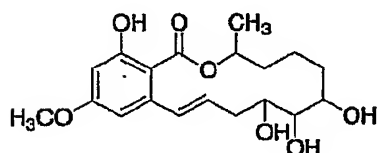
(10)



(11)



(12)



(13)

から選択される、請求項1に記載の阻害剤。

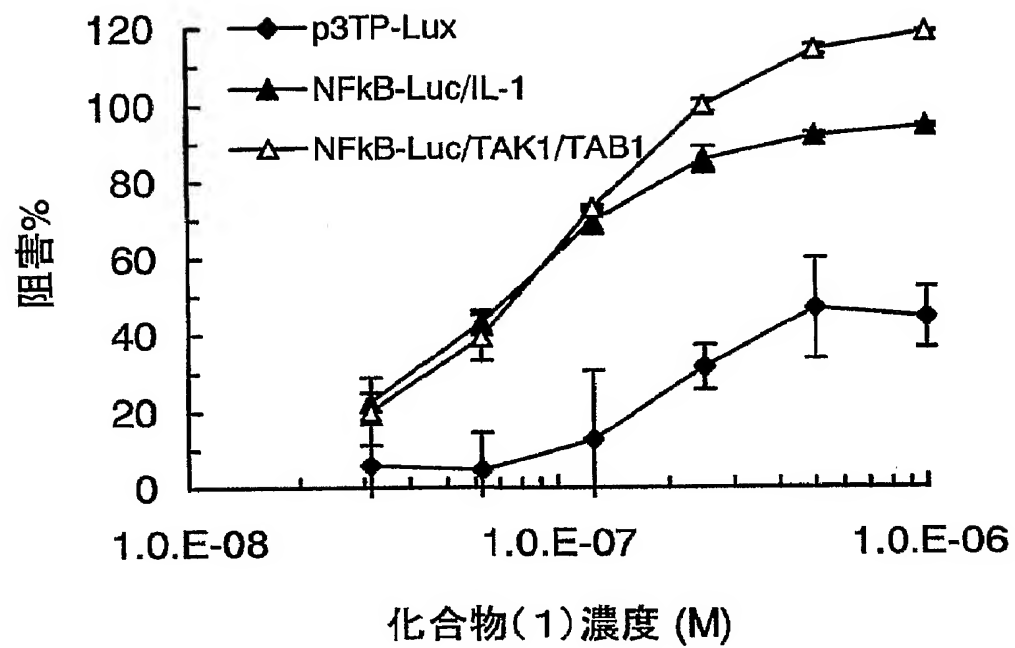
3. 化合物が、化合物(1)、(2)または(3)である、請求項2に記載の阻害剤。

5 4. 8位及び9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類を有効量用いる、TAK1を阻害する方法またはTAK1の活性化を阻害する方法。

5. TAK1阻害剤またはTAK1活性化阻害剤を製造するための8位及び9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類の使用。

10 6. 8位及び9位のいずれにも水酸基を有するゼアラレノン類および使用説明書を含むTAK1を阻害するためのキットまたはTAK1の活性化を阻害するためのキット。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07D313/00, C07D493/04, A61K31/365, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07D313/00, C07D493/04, A61K31/365, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATSUOKA, Masato et al., "Inhibition of HgCl ₂ -induced mitogen-activated protein kinase by LL-Z1640 in CCRF-CEM cells", Eur. J. Pharmacol., (2000), Vol.409, pages 155 to 158	1-3, 5, 6
Y	RAWLINS, Philip et al., "Inhibition of endotoxin-induced TNF- α production in macrophages by 5Z-7-oxo-zeaenol and other fungal resorcylic acid lactones", International Journal of Immunopharmacology, (1999), Vol.21, pages 799 to 814	1-3, 5, 6
Y	YAMAGUCHI, Kyoko et al., "Identification of a Member of the MAPKKK Family as a Potential Mediator of TGF- β Signal Transduction", Science, (1995), Vol.270, pages 2008 to 2011	1-3, 5, 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 February, 2002 (14.02.02)

Date of mailing of the international search report
05 March, 2002 (05.03.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10927

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0606044 A1 (Sandoz, Ltd.), 13 July, 1994 (13.07.1994), Full text & JP 6-228122 A & AU 5211293 A & CA 2110553 A & CN 1095417 A & CZ 9302614 A & FI 935409 A & HU 65910 A & MX 9307608 A & NO 934372 A & NZ 250344 A & PL 301281 A & SK 135493 A & ZA 9309088 A	1-3, 5, 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/10927

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 4 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C07D313/00, C07D493/04, A61K31/365, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C07D313/00, C07D493/04, A61K31/365, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MATSUOKA Masato et al., Inhibition of HgCl ₂ -induced mitogen-activated protein kinase by LL-Z1640 in CCRF-CEM cells, Eur. J. Pharmacol., 2000, vol.409, pp.155-158	1-3, 5, 6
Y	RAWLINS Philip et al., Inhibition of endotoxin-induced TNF- α production in macrophages by 5Z-7-oxo-zeaenol and other fungal resorcylic acid lactones, International Journal of Immunopharmacology, 1999, Vol.21, pp.799-814	1-3, 5, 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.02.02

国際調査報告の発送日

05.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一



4P

2939

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMAGUCHI Kyoko et al., Identification of a Member of the MAPKKK Family as a Potential Mediator of TGF- β Signal Transduction, Science, 1995, Vol.270, pp.2008-2011	1-3, 5, 6
Y	EP 0606044 A1 (SANDOZ LTD.) 1994. 07. 13, 全文 & JP 6-228122 A & AU 5211293 A & CA 2110553 A & CN 1095417 A & CZ 9302614 A & FI 935409 A & HU 65910 A & MX 9307608 A & NO 934372 A & NZ 250344 A & PL 301281 A & SK 135493 A & ZA 9309088 A	1-3, 5, 6

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲4は、治療による人体の処置方法に関するものであるから、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。